

Annett Neuner  
Dr. sc. hum.

## **Klinische Relevanz der Zytokinsekretion beim Bronchialkarzinom**

Geboren am 25.09.1970 in Jena

Diplom der Fachrichtung Biologie am 09.07.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Herr Priv.-Doz. Dr. med. J. R. Fischer

Ziel der in dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen ist es gewesen, die prognostische Bedeutung ausgewählter Zytokine beim kleinzelligen ( $n = 144$ ) und beim Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ( $n = 90$ ) an grossen Patientenkollektiven zu validieren.

Dazu wurde bei allen Patienten prätherapeutisch und bei ausgewählten Patienten zusätzlich auch posttherapeutisch Blut entnommen. Das Blut wurde mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert und für definierte Zeiten bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  kultiviert. In den resultierenden Kulturüberständen wurden folgende Zytokine gemessen: Interleukin  $1\beta$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Interleukin 2, Interleukin 10, Interleukin 6 und Interferon  $\gamma$ . Zur Messung dieser Zytokine wurden sogenannte Sandwich-Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA), basierend auf Antikörper-Paare der Firmen Pharmingen und R&D-Systems, etabliert. Die Korrelation zwischen der Zytokinsekretion und dem Überleben wurde univariat nach der Methode von Kaplan und Meier und multivariat mittels Cox-Regressionsanalyse untersucht. Für die einzelnen Zytokine wurden individuelle Trennwerte (Cut-off Werte) nach dem sogenannten Critlevel-Verfahren nach Abel et al. ermittelt, die eine optimale Trennung prognostischer Gruppen erlauben.

Die erhobenen Messwerte der beiden verwendeten ELISA-Meßsysteme zeigen eine gute Korrelation zueinander und führen zu vergleichbaren Messdaten. Sie verdeutlichen damit die Verwendbarkeit beider ELISAs. Der ELISA-Test, basierend auf den Antikörpern von R&D-Systems, zeichnete sich durch eine bessere Reproduzierbarkeit der Messergebnisse aus.

Die Blutproben für die Untersuchungen wurden maximal 2 h bzw. 24 h nach Blutabnahme stimuliert. Da für die internationale SILVA-Studie auf eingesandte Blutproben anderer Studienzentren zugegriffen wurde, d.h. ca. 24 h nach Blutabnahme, war es notwendig gewesen, die Kompatibilität der Ergebnisse zu diesem Stimulationszeitpunkt mit denen der Standardinkubation (2 h nach Blutentnahme) zu untersuchen. Bei der SILVA-Studie handelt

es sich um eine Immunisierung von SCLC-Patienten (Tumorstadium *limited disease*) mit einem antiidiotypischen Antikörper im Anschluss an eine Standardtherapie. Ziel der Zytokinmessungen war es, den "Immunstatus" der Patienten unter Vakzinierung und im Follow-up zu charakterisieren.

Hierbei zeigte sich, dass die Zytokin-Messdaten zu beiden Stimulierungszeitpunkten gut miteinander korrelieren. Jedoch sind die Konzentrationen der einzelnen Zytokine in den Kulturüberständen des 24 h nach Blutabnahme stimulierten Vollblutes deutlich niedriger.

Beim Kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC) gehen sowohl IL-2 als auch IFN $\gamma$  als unabhängige, prognostische Faktoren hervor. Niedrige IL-2 ( $\leq 155$  pg/ml) und IFN $\gamma$  ( $\leq 25772$  pg/ml)-Sekretionsraten sind mit schlechterem Überleben korreliert. Patienten mit prätherapeutisch hoher in-vitro Zytokinsekretion weisen eine bessere Tumorresponse auf Therapie auf.

Bei Patienten, bei denen Blutproben auch nach Therapie vorlagen, konnte - abhängig vom Stimulationszeitpunkt - ein signifikanter Zusammenhang mit dem Überleben für die Zytokine IL-2, IL-10, IL-6 und IL-1 $\beta$  gezeigt werden. Bei Patienten mit therapiebedingter ansteigender bzw. abnehmender IL-2 Sekretion ergab sich kein signifikanter Unterschied im Überleben. Die Änderung in der Zytokinsekretion von IL-2, IL-10, IL-6 und IFN $\gamma$  zwischen prätherapeutischer und posttherapeutischer Messung lässt eine marginal höhere Remissionsrate (partiell/komplett) bei Patienten mit ansteigender Zytokinsekretionsleistung nach Therapie erkennen. Für TNF $\alpha$  fanden sich annähernd identische Therapieresponse-Daten.

Bei 90 Patienten mit Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) wurde in der multivariaten Analyse neben dem Vorhandensein von Fernmetastasen, dem etablierten Tumormarker CEA auch die im Kulturüberstand des prätherapeutischen Vollblutes gemessene IL-2 Konzentration als unabhängiger Prognosefaktor ermittelt. IFN $\gamma$  geht ähnlich, wie auch schon beim SCLC gezeigt, als - hinsichtlich der prognostischen Wertigkeit mit dem IL-2 - vergleichbarer Faktor hervor. Auch beim NSCLC korreliert eine verminderte IL-2 Sekretion mit kürzerem Überleben.

In Untersuchungen mit Blutproben gesunder Probanden wurde der Effekt von IL-10 auf die IL-2 Sekretion geprüft. Vorbehandlung des Blutes mit IL-10 ergab eine von der IL-10 Konzentration abhängige Suppression der IL-2 Sekretionsleistung. Die in-vitro Untersuchungen mit IL-10-behandeltem Probandenblut deuten auf einen IL-2

Suppressionsmechanismus hin, der möglicherweise in-vivo durch das vom Tumor selbst produzierte IL-10 vermittelt wird.